APLICACIONES DE LA CITOMETRIA DE FLUJO EN LA PRACTICA CLINICA

Dra. Nora Galassi
ngalassi2010@gmail.com

GRUPO RIOPLATENSE DE CITOMETRIA DE FLUJO

I M E X
CONICET
A N M

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA BUENOS AIRES

- **Subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica**

- **Inmunotipificación superficial e intracitoplasmática en oncohematología**

- **Hematopoyesis normal**

- **Detección de enfermedad mínima residual (EMR)**

- **Análisis de resistencia a múltiples drogas**

- **Patología plaquetaria**

- **Cuantificación de ADN como marcador genético de células cancerígenas en suspensión o en tumores sólidos. Ciclo celular, estudios de proliferación celular, contenido de RNA**

- **Detección de apoptosis**

-Actividad de Células NK

-Monocitos, Células Dendríticas y Granulocitos (Neutrófilos, Eosinófilos y Basófilos)

-Glóbulos Rojos: Marcadores asociados, recuento de reticulocitos

-Fisiología celular: viabilidad celular, concentración de Ca^{2+} intracelular, estallido respiratorio, endocitosis, cambios en el potencial de membrana, niveles de pH intracitoplasmático

-Antígenos intracitoplasmáticos

-Prueba Cruzada para la detección de auto/aloanticuerpos en transplantes

-Microesferas

-Microbiología, Veterinaria y Agricultura

-Interacciones celulares: FRET, fusion celular, formación de conjugados

GRUPO RIOPLATENSE DE CITOMETRIA DE FLUJO

IMEX CONICET A N M

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA BUENOS AIRES

Cómo detectar un antígeno por Citometría de Flujo

❖**Anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados con Fluorocromos para inmunofluorescencia directa o purificados y revelados con un segundo antisuero conjugado a fluorocromos para indirecta.**
a) Simples. Ej: FITC, PE, PerCP, Cy5, Alexa 488
b) en Tandem: PE-Cy5, PE-TR

❖**Moléculas, que se unen a estructuras determinadas, conjugadas o no con Fluorocromos.**
Ej. Annexina V, PI, 7-AAD.

❖**Sistemas Enzimáticos**
Ej. Biotina-Streptavidina conjugada con fluorocromo.

❖ **Sondas Moleculares (Molecular Probes)**
a) Con fluorescencia intrínseca
Ej. GFP (Green Fluorescent Protein)
b) Inactivos en su forma nativa pero se hacen fluorescentes por determinadas condiciones del medio ambiente o cuando se unen a determinadas estructuras
Ej. Fluo-3, SNARF-1

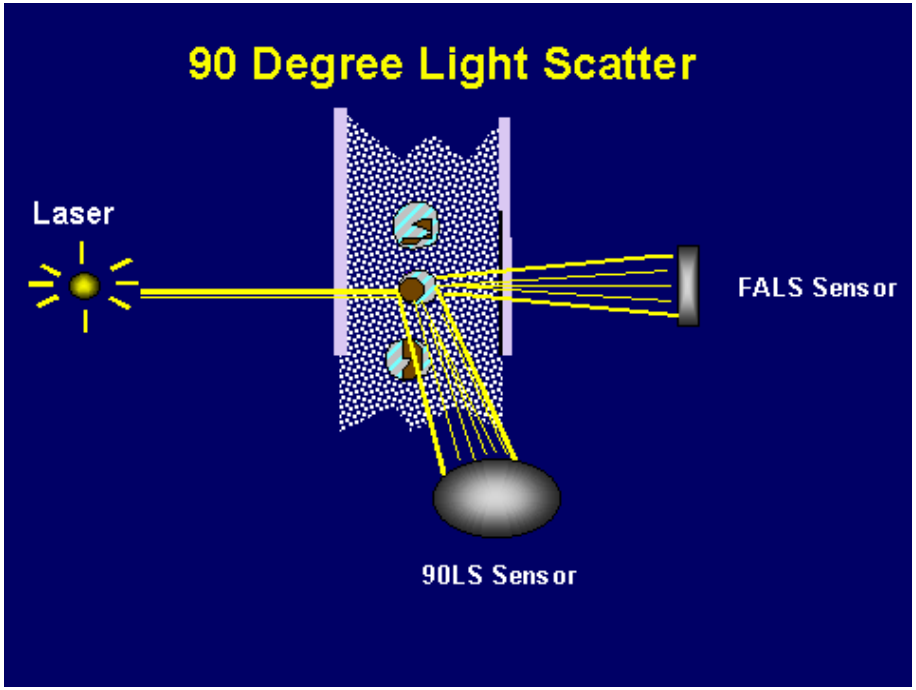
GRUPO RIOPLATENSE DE CITOMETRIA DE FLUJO

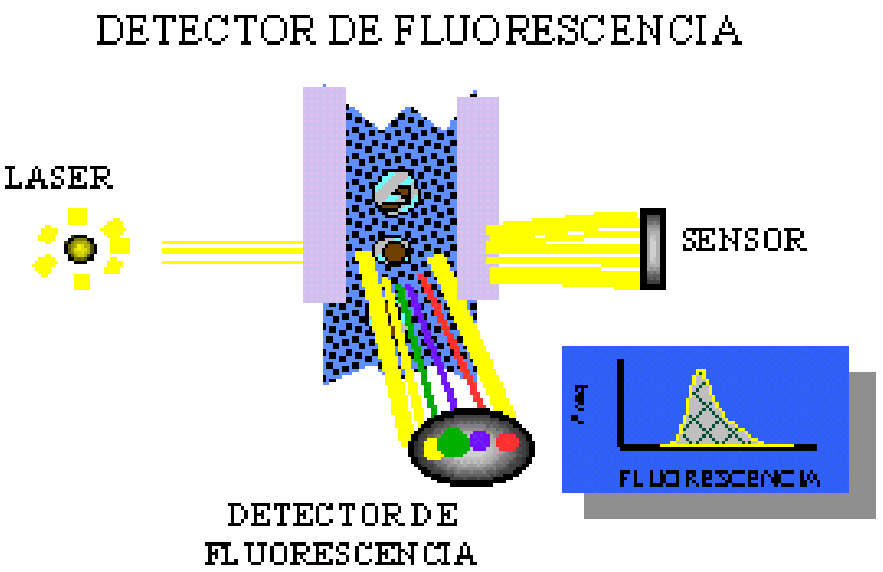
I M E X
CONICET
A N M

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA BUENOS AIRES

Características generales de la citometría de flujo

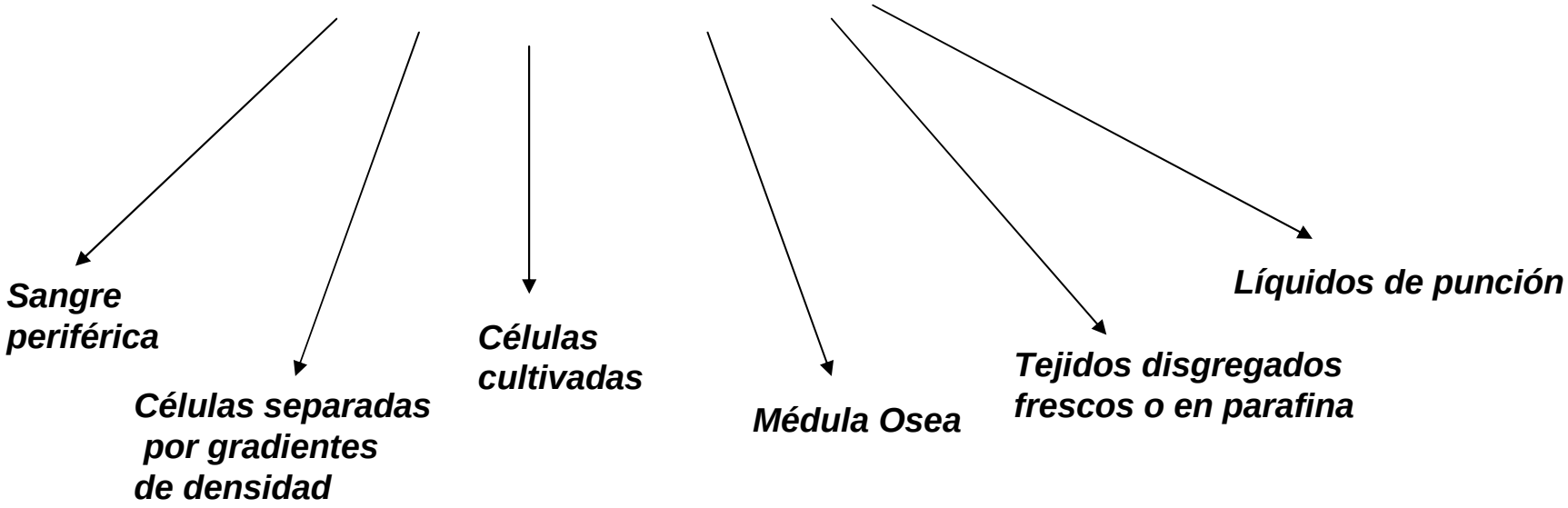
- **Permite el análisis de células individuales**
- **Permite el análisis de muchas células en poco tiempo**
  Ej: 10.000 células en un minuto.
- **Permite el estudio de poblaciones celulares de muy baja frecuencia sin recurrir a**
- **Permite la evaluación de varios parámetros simultáneos en la misma célula con muy poca manipulación de la muestra.**
- **Permite el recuento absoluto de células en suspensión**
- **Permite la medición de sustancias solubles.**
- **Permite realizar estudios funcionales.**
- **Permite la separación de células por “sorting”**



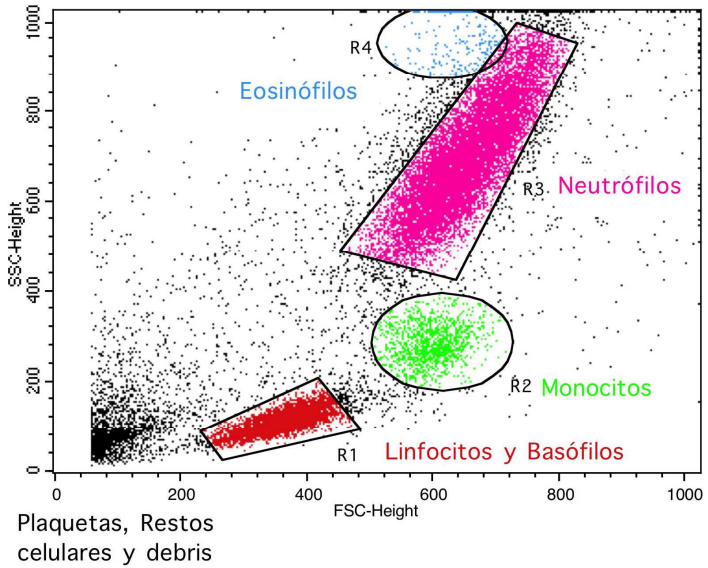


Análisis multiparamétrico

Células en suspensión



Adquisición de poblaciones celulares de sangre periférica

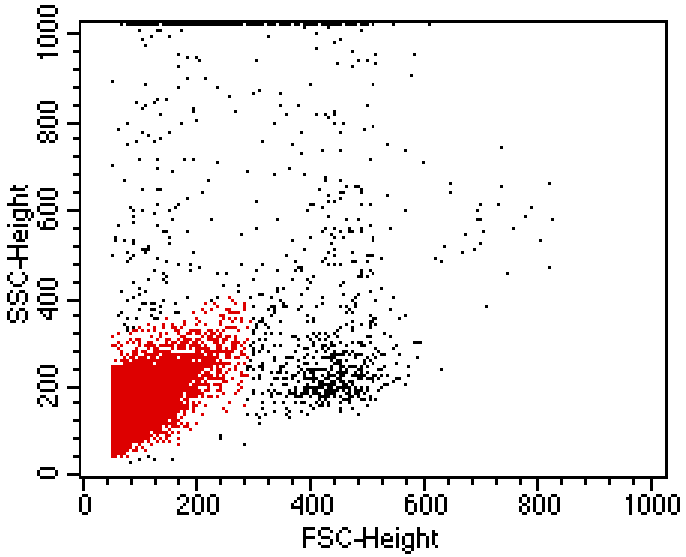


-Tienen diferentes características de tamaño y complejidad.
Estos parámetros se adquieren con amplificación lineal

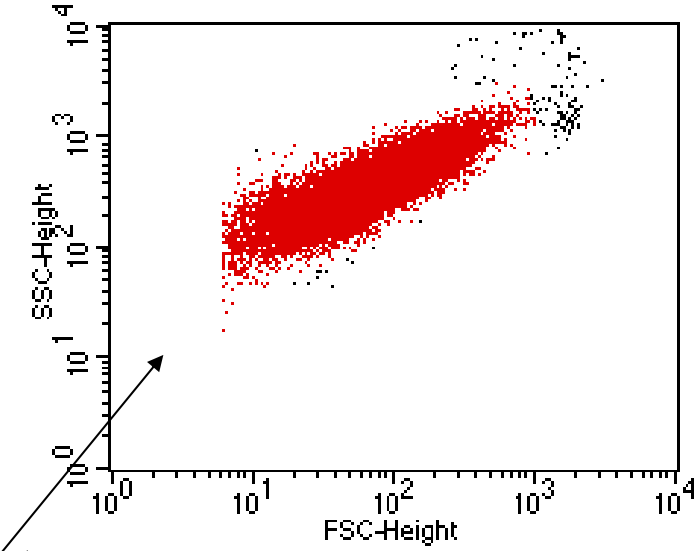
-Tienen marcadores de superficie que los definen o identifican.
La fluorescencia de superficie se adquiere con amplificación log

Adquisición de células pequeñas

Lineal

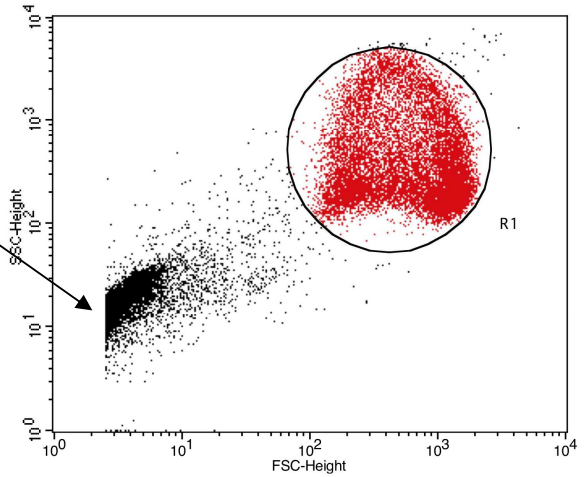


Logarítmica

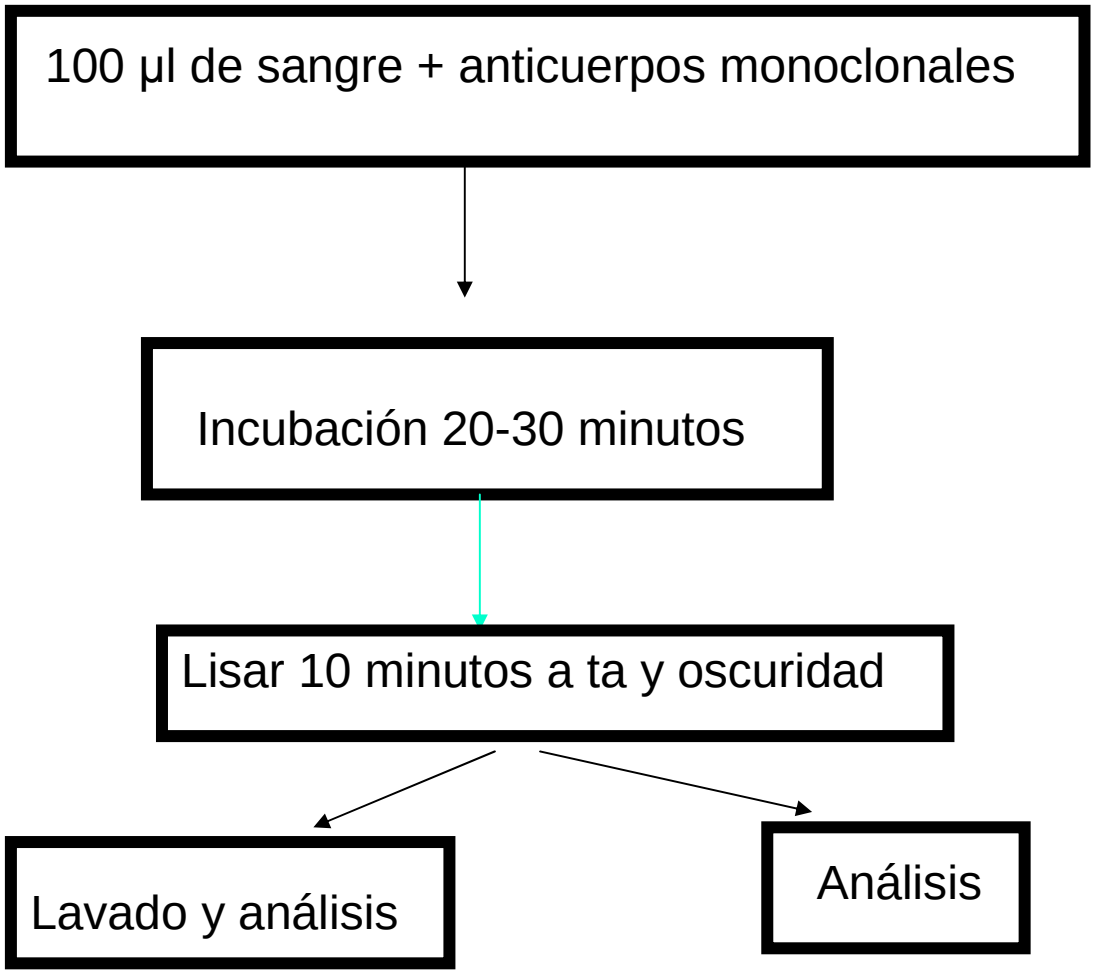


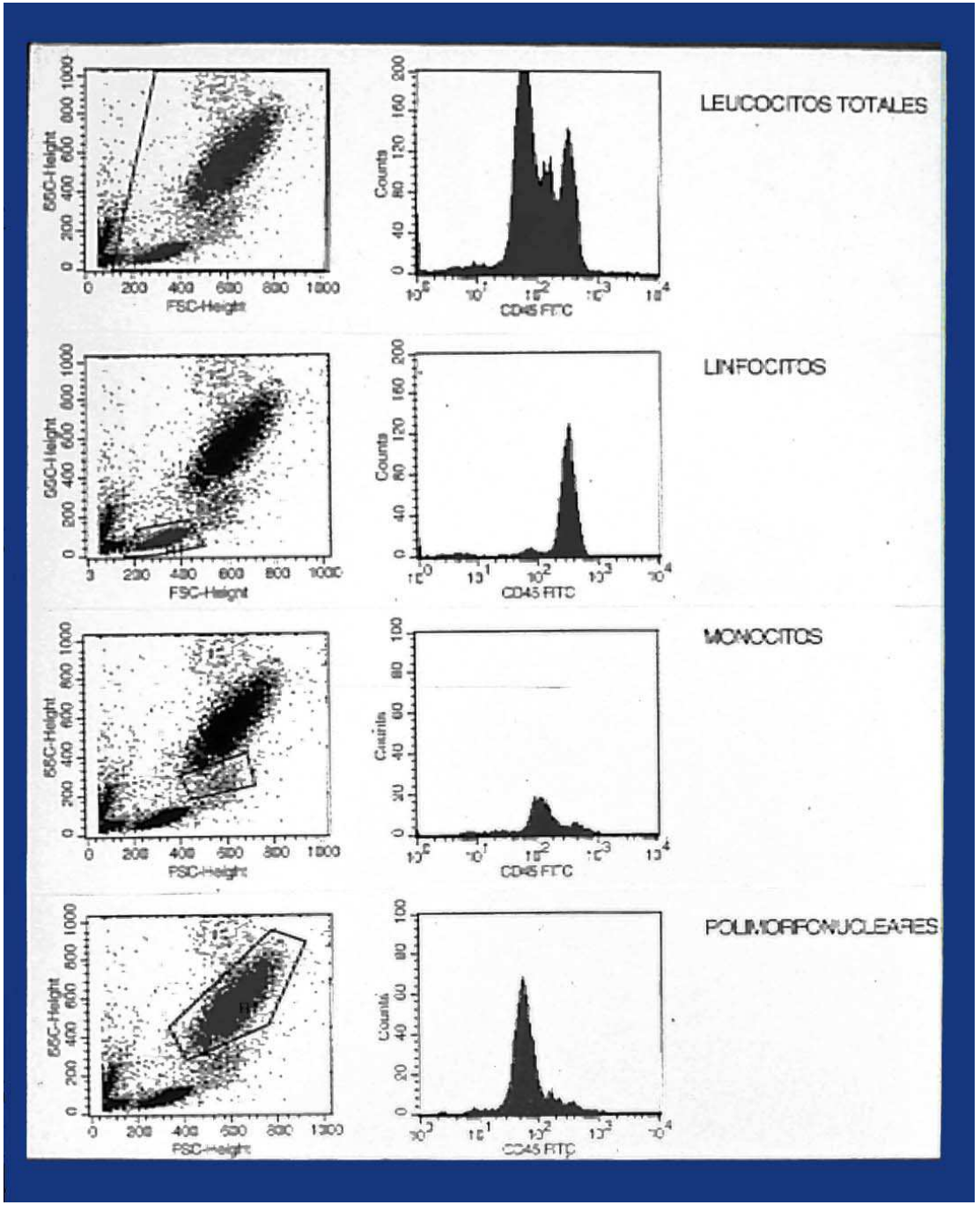
Unidades logarítmicas

Umbral=200
En el FSC
Flujo Lento



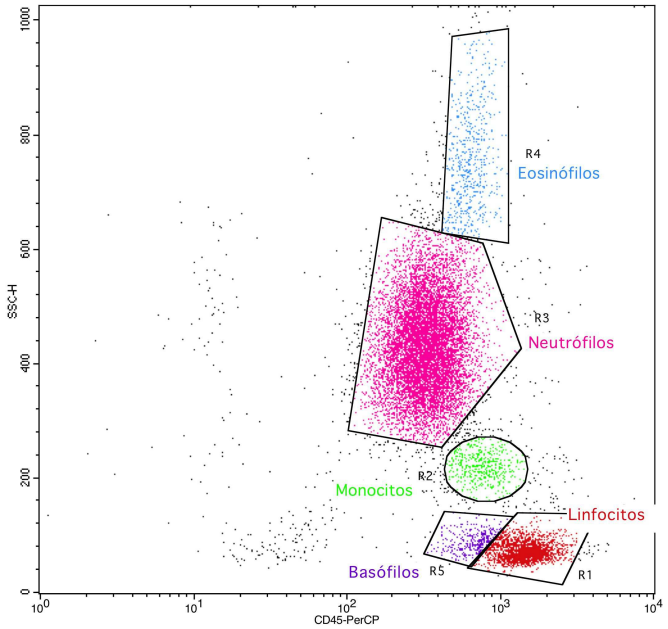
Marcación en Sangre periférica


100 µl de sangre + anticuerpos monoclonales
Incubación 20-30 minutos
Lisar 10 minutos a ta y oscuridad
Lavado y análisis
Análisis


LEUCOCITOS TOTALES
LINFOCITOS
MONOCITOS
POLIMORFONUCLEARES
SSC-Height
FSC-Height
Counts
CD45 FITC

NEUTROPHILS
MONOCYTES
LYMPHOCYTES
UNGATED
CD14 PE
CD45 FITC
Side Light Scatter
Forward Light Scatter

CD45: panleucocitario



-Marcadores de linaje
CD3: Linfocitos T
CD19: Linfocitos B
MPO: Linaje mieloide
CD41: Plaquetas
CD235a: Eritrocitos

-Combinación de marcadores que definen subpoblaciones
CD3CD4: Linfocitos T ayudadores
CD3CD8: Linfocitos T citotóxicos
CD56CD16CD3: Linfocitos NK

-Marcadores de maduración
CD34: células progenitoras

-Marcadores de activación
CD69: linfocitos activados

-Marcadores de memoria inmunológica
CD45RO, CD27, HLA-DR

Se trata de usar la combinación de marcadores que mejor defina la población de interés

Antígenos intracitoplasmáticos

Se puede diferenciar por marcadores de superficie las células productoras (ventaja respecto de otras técnicas como ELISA, Western blot)

Análisis de células individuales

Ejemplos:

Acidos Nucleicos

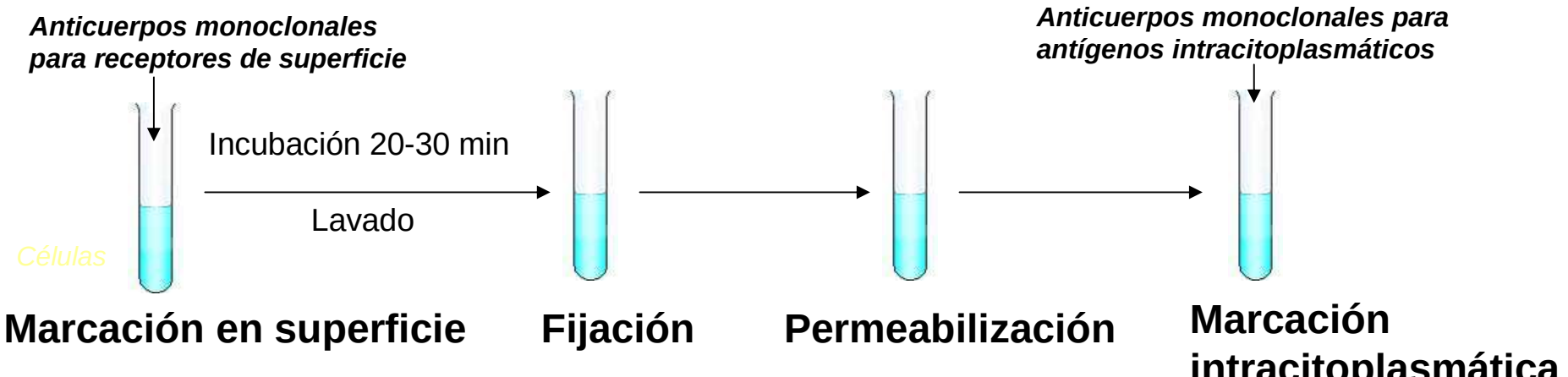
Citoquinas (IFNγ, TNFα, IL-2,IL-4,IL-5,IL-6….)

Mieloperoxidasa, cIgs, cCD3,

Proteínas fosforiladas para el estudio de las vías de señalización (MAPKs, ERK, STAT 1,2,3,4,5,y 6)

Antígenos del ciclo celular: Caspasas activas, Bcl-2, Ki67

Factores de Transcripción (Foxp3, NFkb)



Fin de Clase 1

Muchas Gracias